



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE
ALDEÍDOS BIOINDICADORES DE CÂNCER PULMONAR EM
URINA HUMANA EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO ADSORTIVA
EM BARRA (BA μ E) E HPLC-DAD**

ANDERSON LUIZ OENNING

Florianópolis
Novembro/2015

Anderson Luiz Oenning

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE
ALDEÍDOS BIOINDICADORES DE CÂNCER PULMONAR EM
URINA HUMANA EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO ADSORTIVA
EM BARRA (BA μ E) E HPLC-DAD**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: PROF. Dr. EDUARDO CARASEK DA ROCHA

Coorientadoras: Dra. ADRIANA NEVES DIAS e DANIELA LOPES

Florianópolis
Novembro/2015

Anderson Luiz Oenning

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE
ALDEÍDOS BIOINDICADORES DE CÂNCER PULMONAR EM
URINA HUMANA EMPREGANDO MICROEXTRAÇÃO ADSORTIVA
EM BARRA (BA μ E) E HPLC-DAD**

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Orientador

Prof. Dr. Dilson Roque Zanette

Dr. Waldemar Pacheco de Oliveira Filho

Florianópolis
Novembro/2015

*Este trabalho é dedicado
à minha mãe Vanda.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer à minha mãe pelo apoio, incentivo e sacrifícios, pois se eu cheguei até aqui é devido à ela. Obrigado por tudo mãe, te amo!

Ao meu professor orientador Eduardo Carasek, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela confiança, orientação e transmissão de conhecimentos. Muito obrigado!

Às minhas duas coorientadoras Adriana e Daniela, pela troca de conhecimentos e ensinamentos durante todo o progresso do trabalho, pela paciência e momentos de descontrações no laboratório. Meu muito obrigado, de verdade!

Aos meus amigos e colegas do laboratório 209, Fran, Morés, Ana, Murara, Dai, Camila, Gabi, Mauana, Naysla, Milena, Sângela, Vanessa, Hêlo, Josias, Ivan e Edinho pelo companheirismo, conselhos e conversas descontraídos no laboratório, bares e festas. Vocês são top!

Aos meus amigos Ana Paula, Su, Renata, Bruna, Júlia, William, João e Verli, obrigado pelo apoio e por tantos momentos felizes juntos.

Às minhas amigas que conheci durante o intercâmbio na Irlanda, Bruna, Laís, Alana e Nathália. Obrigado pelos momentos inesquecíveis que passamos em Sligo e nas nossas viagens pela Europa e África e pela continuação da nossa amizade até os dias de hoje. Saudades!

À minha família que sempre me deu total apoio nas minhas decisões e entendeu minha ausência nos momentos familiares, principalmente aos meus avôs Simão e Erica, aos meus irmãos Lucas e Jessyca, e minhas primas, tias e tios Brenda, Rê, Sara, Thai, Malaica, Siça, Ade, Téia, Tita, Bibi, Nani, Wezeley e Gerson. Meu muito obrigado!

Aos meus amigos e outras pessoas que de alguma forma estiveram envolvidas nessa jornada, meu muito obrigado!

À UFSC por me conceder o espaço físico, materiais didáticos, ensino público e de qualidade para o progresso dos meus estudos.

Aos professores que compartilharam seus conhecimentos dessa ciência tão linda chamada Química e que colaboraram para a minha formação.

Ao PIBIC/CNPQ pela bolsa de iniciação científica concedida.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Câncer de pulmão.....	15
2.2 Preparo de amostra	16
2.2.1 <i>Microextração adsortiva em barra</i>	16
2.3 Biossorventes	20
2.4 Analitos estudados.....	22
2.5 Otimização de métodos analíticos	25
2.6 Cromatografia líquida de alta eficiência	28
2.6.1 <i>Instrumentação</i>	28
2.6.2 <i>Modo de detecção</i>	30
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
3.2.1 <i>Objetivos alcançados</i>	31
3.2.2 <i>Objetivos futuros</i>	31
4 METODOLOGIA	32
4.1 Materiais e reagentes	32
4.2 Amostras de urina	32
4.3 Preparo da barra adsortiva	33
4.4 Condicionamento da barra adsortiva.....	34
4.5 Impregnação de DNPH na barra adsortiva	35
4.6 Extração.....	35

4.7 Instrumentação e condições cromatográficas.....	35
4.8 Otimizações da técnica de microextração adsorptiva em barra.....	36
4.8.1 Otimização do pH da extração	36
4.8.2 Otimização do(s) solvente(s) da dessorção.....	36
4.8.3 Otimização do tempo de dessorção	37
4.8.4 Otimização da quantidade de DNPH e do tempo de extração	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 Otimizações cromatográficas.....	39
5.1.1 Tempo de retenção dos analitos	39
5.1.2 Estudo da eficiência da derivatização	40
5.1.3 Escolha do(s) solvente(s) empregado(s) na separação cromatográfica	43
5.1.4 Verificação da seletividade da barra adsorptiva e da separação cromatográfica.....	44
5.2 Nova proposta para a técnica de BAμE	45
5.3 Otimizações do método	47
5.3.1 Otimização do pH da extração	47
5.3.2 Otimização do(s) solvente(s) da dessorção.....	48
5.3.3 Otimização do tempo de dessorção	49
5.3.4 Otimização da quantidade de DNPH e do tempo de extração	49
6 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Barra para SBSE.

Figura 2 – Representação esquemática: (a) imagem e micrografia obtida por microscopia eletrônica por varredura e (b) do dispositivo usado na técnica de BA μ E.

Figura 3 – Representação esquemática e imagens exemplificando os modos de operação das técnicas BA μ E e MSA μ E. Legenda: (1) vortex, (2) amostra, (3) barra magnética, (4) dispositivo de BA μ E, (5) dispositivo de MSA μ E.

Figura 4 – Esquema do procedimento da dessorção líquida. Legenda: (1) barra adsortiva e (2) frasco contendo o solvente de dessorção.

Figura 5 – Cortiça usada como fase extratora na BA μ E.

Figura 6 – Representação da estrutura da lignina.

Figura 7 - Estrutura dos aldeídos estudados.

Figura 8 – Reação geral de derivatização de um aldeído com DNPH.

Figura 9 – Estrutura química dos esteroisômeros E Z da hidrazona do acetaldeído.

Figura 10 - Planejamento *Doehlert*.

Figura 11 – Planejamento da superfície triangular.

Figura 12 – Instrumentação de cromatografia líquida de alta eficiência.

Figura 13 – Procedimento de preparo das barras adsortivas.

Figura 14 – Procedimento de condicionamento da barra adsortiva.

Figura 15 – Procedimento de impregnação do derivatizante na barra adsortiva.

Figura 16 - Cromatograma obtido a partir da injeção de 20 μL da solução da mistura dos aldeídos de concentração 200 mg/L.

Figura 17 - Cromatograma obtido a partir injeção de 20 μL da solução da mistura dos aldeídos de concentração 500 mg/L.

Figura 18 - Cromatograma obtido a partir da extração com a mistura dos aldeídos de concentração 500 $\mu\text{g/L}$ sem derivatização.

Figura 19 - Cromatograma obtido a partir da extração com a mistura dos aldeídos de concentração 500 $\mu\text{g/L}$ com derivatização.

Figura 20 - Cromatograma do branco da barra adsortiva.

Figura 21 - Cromatograma obtido a partir da extração com a mistura dos aldeídos de concentração 500 $\mu\text{g/L}$ com derivatização e fase móvel otimizada.

Figura 22 - Cromatograma do branco da barra adsortiva na presença de urina.

Figura 23 - Esquema proposto da modificação da técnica de BA μ E.

Figura 24 – Gráfico da otimização do pH da extração.

Figura 25 – Superfície resposta da otimização do(s) solvente(s) de dessorção líquida.

Figura 26 - Gráfico da otimização do tempo de dessorção.

Figura 27 – Superfície resposta obtida para a otimização da quantidade de DNPH e do tempo de extração.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comprimento de onda máximo dos esteroisômeros E e Z de hidrazonas obtidas por derivatização com DNPH.

Tabela 2 – Planejamento de superfície triangular para a escolha do solvente ou mistura de solventes na dessorção.

Tabela 3 - Planejamento *Doehlert* para a otimização da quantidade de DNPH e do tempo de extração.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A μ E – Microextração Adsorptiva, *do inglês Adsorptive Microextraction*

BA μ E – Microextração Adsorptiva em Barra, *do inglês Bar Adsorptive Microextraction*

DAD – Detector por Arranjo de Diodos, *do inglês Diode Array Detector*

DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazina, *do inglês 2,4-dinitrophenylhydrazine*

GC – Cromatografia Gasosa, *do inglês Gas Chromatography*

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, *do inglês High Pressure Liquid Chromatography*

LLE – Extração Líquido-Líquido, *do inglês Liquid-Liquid Extraction*

MNBDH - N-metil-4-hidrazino-7-nitrobenzofurazano, *do inglês N-methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzofurazan*

MSA μ E - Microextração Adsorptiva em Multiesferas, *do inglês Micro-spheres Adsorptive Microextraction*

PDMS – Polidimetilsiloxano

PFBHA – Cloridrato de o-(2,3,4,5,6-penta-fluorobenzil)-hidroxilamina, *do inglês o-(2,3,4,5,6-penta-fluorobenzil)-hydroxylamine hydrochloride*

RSD (%) – Desvio Padrão Relativo, *do inglês Relative Standard Deviation*

SBSE - Extração Sortiva em Barra de Agitação, *do inglês Stir Bar Sorptive Extraction*

SPME - Microextração em Fase Sólida, *do inglês Solid-Phase Microextraction*

UV – Ultravioleta, *do inglês Ultraviolet*

RESUMO

Neste trabalho foi proposto um remodelamento inédito para a técnica de microextração adsorptiva em barra e foi sugerido a impregnação do derivatizante na barra adsorptiva contendo um material biossorvente. O reagente derivatizante utilizado foi o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) que foi adsorvido na superfície da cortiça utilizada como fase extratora na BA μ E para a determinação de dois aldeídos conhecidos como bioindicadores de câncer pulmonar (hexanal e heptanal) em amostras de urina humana. A derivatização e extração dos aldeídos ocorreram simultaneamente na superfície de barras de BA μ E de 15 mm sob condições ácidas e as otimizações do método foram realizadas de forma univariadas e multivariada. As condições ótimas de extração foram razão molar entre o DNPH e os aldeídos igual a 40:1, pH da solução tampão igual a 4,0, tempo de extração de 60 min e dessorção líquida por 10 min em 250 μ L de acetonitrila. Os aldeídos foram analisados por HPLC-DAD e a corrida cromatográfica ocorreu de forma simples e rápida em apenas 7 min.

Palavras-chave: câncer pulmonar, BA μ E, cortiça, hexanal, heptanal, DNPH, urina.

1 INTRODUÇÃO

A busca por uma vida saudável sempre foi e continua sendo algo de extrema importância para a maior parte da população mundial, na qual essas pessoas almejam por uma maior qualidade de vida que influencia diretamente no aumento da longevidade, no bem-estar e na maior predisposição para as tarefas diárias como trabalho e estudos. Mas nem sempre esse objetivo é alcançado com sucesso, sendo impedido, na maioria das vezes, pela aquisição de doenças de diversos tipos, como por exemplo, o câncer.

Dentre os diversos tipos de câncer já conhecidos pela Medicina, o câncer de pulmão recebe destaque, pois ele atinge uma grande parcela da população mundial e é um dos principais responsáveis de mortalidades por câncer. Esse tipo de câncer é geralmente ocasionado pelo tabagismo por um longo período de tempo, inalação de poeira e poluição atmosférica, fumo passivo e em alguns casos devido a fatores genéticos.

Os primeiros sintomas característicos desse tipo de doença somente começam a aparecer quando o câncer já está em um estágio bastante avançado. Dessa maneira, o diagnóstico precoce desse tipo de doença é um forte aliado para que a pessoa receba o melhor tratamento desde os primeiros sintomas, visando na sua recuperação rápida e eficaz.

Estudos indicam que compostos como hexanal e heptanal são bioindicadores do câncer de pulmão, pois são produtos de reações de lipídeos que ocorrem no interior dos pulmões. Deste modo, métodos de determinação desses compostos têm sido estudados para atuarem como uma alternativa a falta de sintomas na fase inicial da doença, visto que isso prejudica o processo de identificação do câncer de pulmão.

Desta forma, o propósito geral desse trabalho consiste no desenvolvimento de um procedimento eficiente de preparo de amostra para a extração de hexanal e heptanal em urina humana utilizando a técnica de microextração adsorbtiva em barra (BA μ E) e cortiça como material sorvente aliada a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) como técnica de separação e detecção dos compostos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer de pulmão

Câncer é a palavra utilizada para um grupo de mais de 100 doenças causadas pelo crescimento desenfreado de células que invadem os tecidos e órgãos de uma pessoa, podendo ser disperso para outras regiões do corpo. Essas células se dividem ligeiramente dentro do corpo, tornando-as agressivas e incontroláveis, formando um acúmulo de células cancerígenas, e a essa acumulação dá-se o nome de tumor maligno. Por outro lado, as células que se multiplicam em uma velocidade menor formando tecidos de aparência semelhante do tecido original, recebem o nome de tumor benigno, que raramente representa riscos de vida ^[1]. O câncer pode ser disseminado para os outros órgãos do corpo, na qual as células cancerígenas se desprendem do tumor primário e entram na corrente sanguínea ou no sistema linfático, sendo carregados para outros órgãos, essa disseminação recebe o nome de metástase e o novo tumor recebe o nome de metastático ^[2].

As causas do aparecimento de câncer em um indivíduo devem-se a fatores externos e internos, ou até mesmo pelo inter-relacionamento entre eles. Os fatores externos estão relacionados ao meio ambiente e aos costumes e hábitos da sociedade que esse indivíduo está inserido. Os fatores internos devem-se, na maioria das vezes, a fatores genéticos que causam a fragilidade do organismo de se defender das agressões externas ^[1,3].

O câncer de pulmão é o tipo de tumor mais encontrado na população mundial e brasileira, responsável por 22.424 mortes no país em 2011, sendo a principal causa o tabagismo ^[4]. Outras causas também são conhecidas, como a inalação de poeira, de poluição atmosférica e de agentes químicos tais como asbesto, radônio, amianto e arsênio, o fumo passivo, histórico familiar de câncer de pulmão e a predisposição ao tumor vinda de algumas doenças como a tuberculose e a doença pulmonar obstrutiva crônica ^[5].

Os sintomas do câncer de pulmão são os mais diversos: tosse, mudanças no padrão da tosse, tosse com sangue, rouquidão, dor no tórax e falta de ar ^[6].

O diagnóstico desse tipo de doença é realizado via radiografia torácica complementado por tomografia computadorizada ou uma amostra da área suspeita do

pulmão pode ser retirada para a realização de biópsia por um patologista para a confirmação do tumor. Esse diagnóstico é difícil de ser realizado na fase inicial do tumor, justamente por não existirem os sintomas característicos [5,6]. Por esse motivo, existe a necessidade do desenvolvimento de um método para a identificação da doença no estágio inicial.

2.2 Preparo de amostra

Geralmente em métodos analíticos existe a necessidade de uma etapa chamada de preparo de amostra, que é de fundamental importância para o sucesso do método. Essa etapa geralmente é dependente das características da matriz e do analito, requerendo uma otimização adequada de seus diferentes parâmetros de influência. Embora no passado não se tenha dado muita atenção, principalmente devido aos avanços da instrumentação analítica, hoje em dia esforços têm sido feitos no melhoramento e desenvolvimento de diversas técnicas de preparo de amostra [7].

Algumas das características mais desejadas na técnica de preparo de amostra são a rapidez, a simplicidade, o baixo custo, o aumento da seletividade e da especificidade, o potencial de automação ou utilização de métodos *on-line* e o uso de quantidades mínimas ou nenhuma de solventes orgânicos visando uma menor agressão ao meio ambiente e sem desperdícios [8,9].

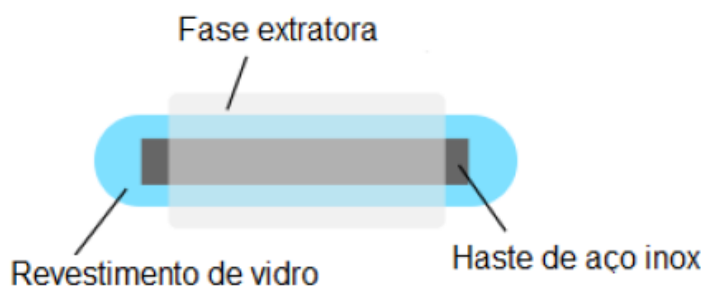
O preparo de amostra é geralmente usado por analistas para superar os problemas da injeção direta da amostra no instrumento analítico, para separar os analitos da matriz da amostra e/ou concentra-los para análises de traço [10].

Nos últimos anos a busca pela simplificação, miniaturização, automação, bem como o emprego de técnicas livres de solventes e outros procedimentos ambientalmente amigáveis tem ganhado bastante destaque [7]. O desenvolvimento e o melhoramento das técnicas miniaturizadas de extração têm apresentado atualmente uma elevada importância, sendo que as técnicas de microextração em fase sólida e microextração em fase líquida tiveram maior notoriedade [11].

2.2.1 Microextração adsortiva em barra

Sabe-se que existem na natureza um vasto número de materiais sólidos que apresentam propriedades físico-químicas e de textura bastante interessantes, na qual a alta porosidade e elevada área superficial são responsáveis pela capacidade de adsorção ^[12]. Tendo em vista essas propriedades, em 1999 surgiu a técnica de SBSE (Extração Sortiva em Barra de Agitação, do inglês Stir Bar Sorptive Extraction) ^[13]. Essa técnica é fundamentada no revestimento do material sorvente em uma barra magnética de agitação, deste modo, existe a integração do material sorvente com o utensílio de agitação em um mesmo dispositivo (Figura 1) ^[14].

Figura 1 – Barra para SBSE.



Fonte: NOGUEIRA (2012)

O principal material sorvente utilizado como fase extratora nessa técnica é o polidimetilsiloxano (PDMS), que apresenta características apolares. Sendo assim, essa técnica é geralmente empregada na extração de compostos apolares ou com polaridade intermediária, o que faz com que essa técnica seja bastante limitada para compostos com essas polaridades. Para solucionar essa limitação, tem sido desenvolvida pesquisas que visam a alteração na estrutura do PDMS, procedimentos de derivatização e de novos revestimentos para essa técnica. Além da introdução de outras técnicas alternativas como a AμE (Microextração Adsorativa, do inglês Adsorptive Microextraction), que utiliza sorventes mais adequados ao tipo de composto que se deseja fazer a extração. Para essa técnica foram propostas duas configurações geométricas: multiesferas e de barra cilíndrica. Deste modo, baseado no formato geométrico surgiram duas novas técnicas: MSAμE (Microextração Adsorativa em Multiesferas, do inglês Micro-spheres Adsorptive

Microextraction) e BA μ E (Microextração Adsorptiva em barra, do inglês Bar Adsorptive Microextraction). Na MSA μ E, esferas de polipropileno são cobertas pelo material sorvente e fixados com tratamento térmico, já na BA μ E, utiliza-se o sorvente em pó fixado em uma fita adesiva acoplada à um tubo de polipropileno em formato de barra cilíndrica (Figura 2). Existe uma pequena limitação quanto a quantidade de material adsorvente fixado na BA μ E, sendo este limitado ao tamanho da fita adesiva, geralmente usa-se 5 mg de material, e na MSA μ E o número de esferas pode ser determinado em relação a concentração dos analitos que serão analisados [12,15].

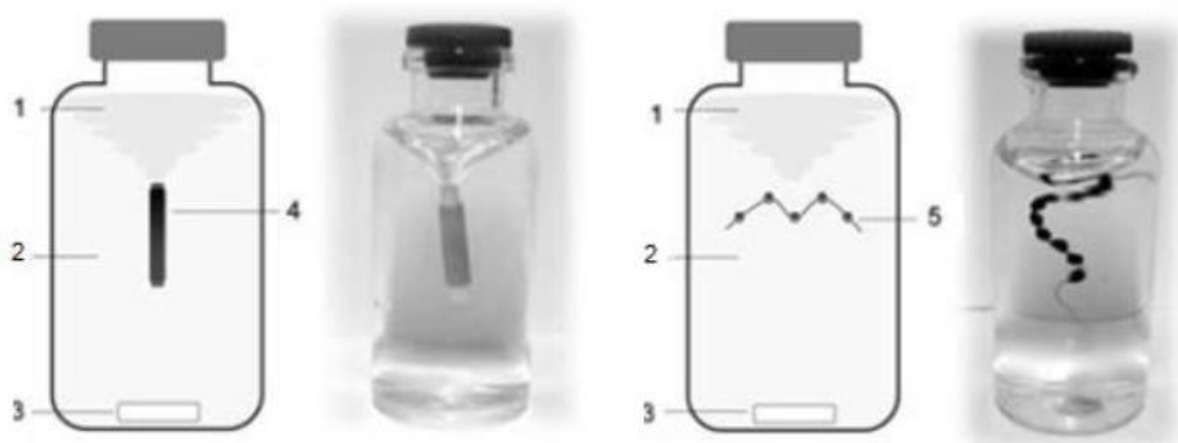
Figura 2 - Representação esquemática: (a) imagem e micrografia obtida por microscopia eletrônica por varredura e (b) do dispositivo usado na técnica de BA μ E.



Fonte: NOGUEIRA (2013)

Como observado na Figura 3, as duas técnicas são baseadas na flutuação, pois os dispositivos utilizados possuem baixa densidade, o que permite a flutuação dos mesmos logo abaixo do vortex formado pela agitação com uma barra magnética convencional. Desse modo, o contato do dispositivo com as paredes ou com o fundo do frasco de amostragem é evitado e a desagregação mecânica das partículas de sorvente é impedida, com isso aumenta-se o tempo de vida médio desses dispositivos [12,15].

Figura 3 - Representação esquemática e imagens exemplificando os modos de operação das técnicas BA μ E e MSA μ E. Legenda: (1) vortex, (2) amostra, (3) barra magnética, (4) dispositivo de BA μ E e (5) dispositivo de MSA μ E.



Fonte: Adaptado de NOGUEIRA (2012).

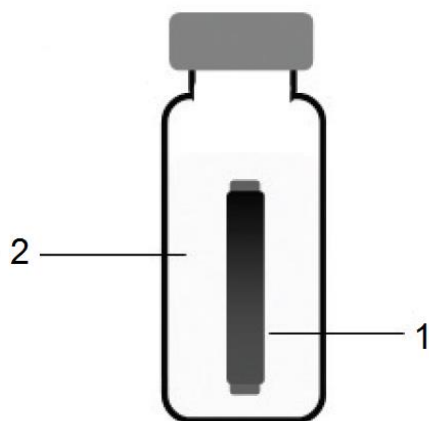
A vantagem do uso dessas técnicas em relação a outras técnicas baseadas em sorção é a capacidade de se escolher o melhor material para atuar como fase extratora para um analito particular ou classe de compostos [12,15].

O procedimento experimental da técnica de BA μ E consiste em duas etapas principais: a extração ou pré-concentração dos analitos da amostra para a fase sorvente e a dessorção dos analitos para serem injetados no instrumento analítico. Ao longo da extração, os analitos são colocados em contato com o material sorvente presente na barra adsorviva, recorrendo ao modo de amostragem por flutuação, como mostrado na Figura 3. A extração é baseada em condições de equilíbrio, com o objetivo de se obter a máxima quantidade adsorvida, desse modo, o controle dos parâmetros experimentais são de extrema importância. Os parâmetros que podem ser otimizados na técnica de BA μ E e MSA μ E são o material sorvente utilizado, tempo de extração, pH da amostra, força iônica e velocidade de agitação, sendo esses estudos realizados por planejamentos univariados ou multivariados [12].

Após a extração, as barras adsorvivas são recolhidas com o auxílio de pinças e submetidas a etapa de dessorção líquida, sendo o tipo de solvente e o tempo as variáveis importantes a serem estudadas. Nessa etapa ocorre a imersão completa da barra

adsortiva em um *vial* ou *insert* contendo o solvente escolhido, na qual é passado por um tratamento ultrassônico para melhorar a eficiência da dessorção (Figura 4) ^[12].

Figura 4 – Esquema do procedimento da dessorção líquida. Legenda: (1) barra adsortiva e (2) frasco contendo o solvente de dessorção.



Fonte: Adaptado de NOGUEIRA (2013)

2.3 Biossorventes

Existem muitos materiais encontrados no meio ambiente constituídos de macromoléculas que possuem vários grupos funcionais que são hábeis para interagir com compostos através de diferentes fenômenos como sorção, complexação e troca iônica. Esse tipo de material é constituído de biomassa, que é definida como toda a matéria orgânica de origem vegetal, animal ou microbiana resultante de processos naturais e artificiais. Os materiais com essas características são conhecidos como biossorventes ^[16].

As propriedades sorventes são características desse tipo de material, ou seja, o volume, a distribuição, o tamanho de poros e os seus sítios ativos são qualidades intrínsecas do produto ^[17]. E por essa extensa biodiversidade existente na natureza, pesquisadores vêm explorando a aplicação de biossorventes em diversas áreas, como o uso em técnicas de microextração. Um exemplo de biossorvente que vem sendo utilizado é a cortiça (Figura 5), na qual foi empregada como sorvente na técnica de BAμE para a

determinação de parabenos, benzofenona e triclocarban ^[18], outra aplicação foi na determinação de pesticidas organoclorados em água ^[19] e na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostras aquosas ^[20], ambas através da técnica de SPME (Microextração em Fase Sólida, *do inglês Solid-Phase Microextraction*).

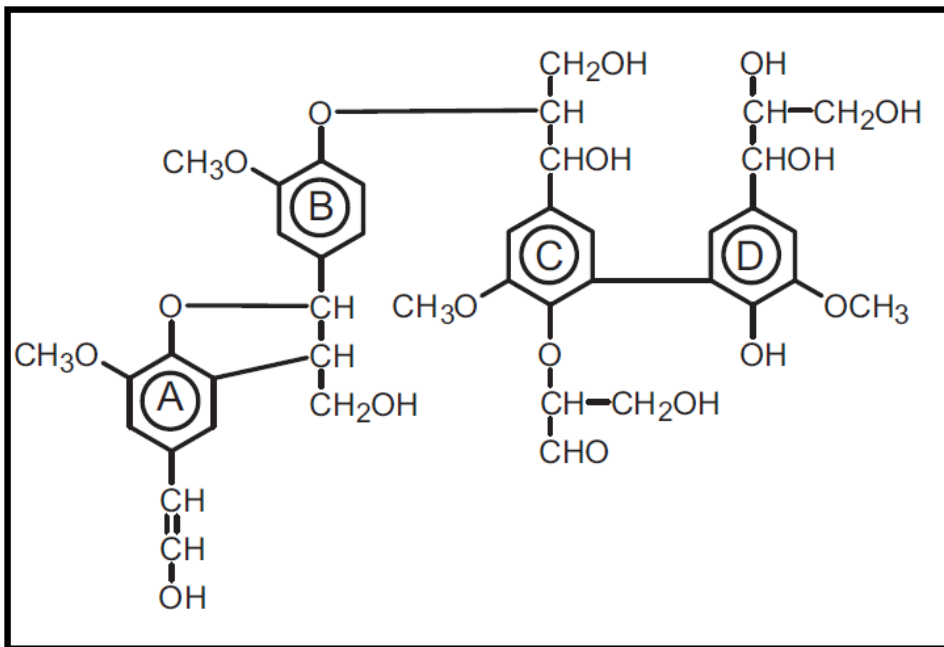
Figura 5 – Cortiça usada como fase extratora na BAμE.



Fonte: Autoria própria (2015)

A cortiça é um material heterogêneo composto de biopolímeros com características hidrofóbicas como a suberina (40%) e a lignina (22%), polissacarídeos (20%) como a celulose e a hemicelulose com caráter hidrofílico e ceras e outros extrativos (15%) ^[21,22]. A presença da lignina na composição da cortiça tem um papel importante nos fenômenos de adsorção que este material possui, porque ela é a principal molécula adsorvente. A Figura 6 abaixo mostra a estrutura da lignina, na qual é possível observar a presença de anéis aromáticos e de grupos –OH, sendo os anéis aromáticos responsáveis por interações π - π com os anéis aromáticos dos adsorvatos e os grupos –OH responsáveis por ligações de hidrogênio com as estruturas dos adsorvatos ^[23].

Figura 6 – Representação da estrutura da lignina.



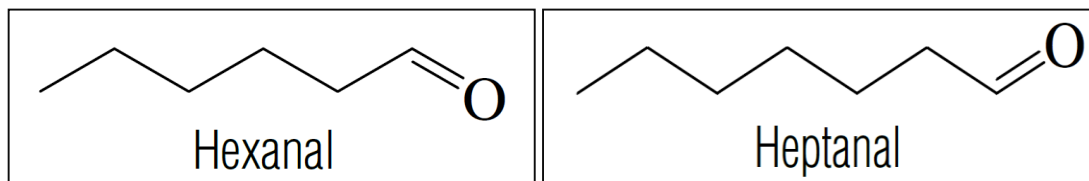
Fonte: OLIVELLA (2015)

Esse trabalho também propõe o uso da cortiça como fase extratora na técnica de BAμE, que é um bioissorvente proveniente da casca do sobreiro (*Quercus suber* L.), sendo um material natural, renovável e biodegradável [21-23]. A cortiça é encontrada nas rolhas de garrafas de vinho, e após seu uso ela é descartada no ambiente, deste modo, a utilização da cortiça como fase extratora para técnicas de extração se faz conveniente visando a redução de resíduos lançados na natureza.

2.4 Analitos estudados

Nesse trabalho foi desenvolvido um método para a determinação de dois bioindicadores de câncer pulmonar, sendo eles o hexanal e o heptanal (Figura 7). Esses compostos estão presentes no sangue, saliva e na urina das pessoas, deste modo, a urina foi a amostra biológica escolhida para a análise. Essa matriz mostra-se bastante complexa para análises cromatográficas devido ao grande número de substâncias presentes. Por isso, é necessária uma etapa de preparo de amostra, na qual a técnica empregada foi a BAμE.

Figura 7 - Estrutura dos aldeídos estudados.



Fonte: Autoria própria (2015)

Os aldeídos são compostos carbonílicos simples e presentes na natureza e em vários sistemas biológicos ^[24,25]. Eles são produtos de reações induzidas de radicais livres, sendo considerados biomarcadores potenciais de estresse oxidativo e doenças relacionadas à carcinogênese e aterosclerose ^[24]. Muitos desses compostos, tais como formaldeído, acetaldeído, acroleína, hexanal, heptanal e benzaldeído são reportados como substâncias relacionadas ao câncer ^[24-26]. Por esses motivos, análises desses compostos têm ganhado destaque. As análises são geralmente feitas em amostras de fluídos biológicos como saliva, sangue e urina. Uma elevada concentração de hexanal e heptanal, por exemplo, tem sido constatada em pacientes de câncer de pulmão, na qual essas substâncias podem ser consideradas um importante indicador de diagnósticos clínicos precoces ^[24].

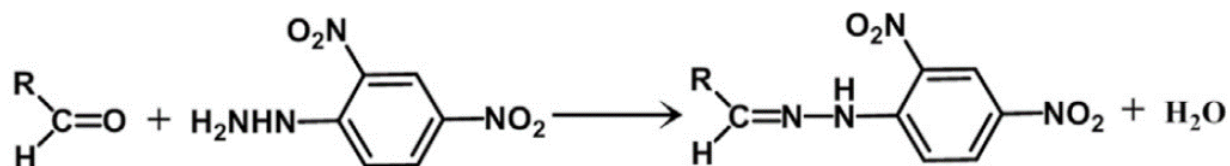
Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa (GC) têm sido largamente utilizadas para a determinação de aldeídos nessas amostras. Entretanto, análise direta em HPLC é dificultada devido à alta volatilidade dos aldeídos, alta reatividade, baixa estabilidade e falta de grupos cromóforos. Desse modo, reações de derivatização possibilitam que esses compostos sejam analisados por HPLC ^[24,25].

Os reagentes mais usados nas reações de derivatização de aldeídos são 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), cloridrato de o-(2,3,4,5,6-penta-fluorobenzil)-hidroxilamina (PFBHA) e N-metil-4-hidrazino-7-nitrobenzofurazano (MNBDH). Sendo o DNPH o mais utilizado em HPLC com detector na região UV-Visível ^[24-26].

O DNPH reage com os aldeídos formando hidrazonas, pois possui um grupo hidrazina (-NHNH₂) que age como sítio ativo na reação de derivatização. Conforme mostrado abaixo na Figura 8 a hidrazona formada possui um anel benzênico que é um

bom grupo cromóforo que absorve na região UV-Visível, no comprimento de onda máximo de 360 nm ^[26].

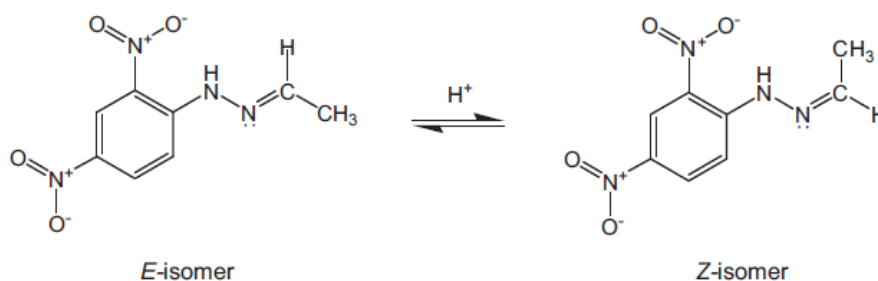
Figura 8 – Reação geral de derivatização de um aldeído com DNPH.



Fonte: LIU *et al* (2015)

As análises que utilizam a derivatização com o DNPH para identificação e separação de aldeídos podem causar erros analíticos devido ao fato de que a hidrazona formada possui os estereoisômeros E e Z devido a presença da dupla ligação C=N (Figura 9). É conhecido que traços de ácidos são responsáveis por catalisarem a reação de isomerização, que foi detectado devido a anomalias nos pontos de fusão ^[27].

Figura 9 – Estrutura química dos estereoisômeros E e Z da hidrazona do acetaldeído.



Fonte: UCHIYAMA *et al.* (2011)

Outra evidência da reação de isomerização é a diferença de comprimento de onda máximo dos dois estereoisômeros observados em espectros de UV, na qual existe uma diferença em uma faixa de 5-8 nm para menos para o isômero Z comparado ao isômero E (Tabela 1) ^[27].

Tabela 1 – Comprimento de onda máximo dos esteroisômeros E e Z de hidrazonas obtidas por derivatização com DNPH.

Aldeído	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) Z-isômero	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) E-isômero
Acetaldeído	360	365
Propanal	358	365
Butanal	358	365
Pentanal	358	365
Hexanal	358	365
Heptanal	358	365
Octanal	358	364

Fonte: Adaptado de UCHIYAMA *et al.* (2011)

Para solucionar esse problema, a literatura sugere a transformação da dupla ligação do C=N para simples ligação através de um agente redutor. Vários tipos desse reagente são conhecidos, tais como ciano hidrobórato de sódio (NaBH_3CN), piridina borano (pyr-BH_3) e 2-picolino borano ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NBH}_3$) [27].

Neste trabalho propõe-se a não utilização de mais um reagente na etapa de derivatização dos aldeídos estudados, mas sim a otimização cromatográfica para que seja possível a quantificação dos dois esteroisômeros formados, desta forma, evitando-se erros analíticos de quantificação.

2.5 Otimização de métodos analíticos

A palavra otimização é usada quando se deseja melhorar o desempenho de um processo, de um sistema ou de um produto para se obter o máximo benefício. Esse termo tem sido utilizado na área de análises químicas quando se deseja obter as condições de um determinado método analítico na qual se tenham as melhores respostas [28].

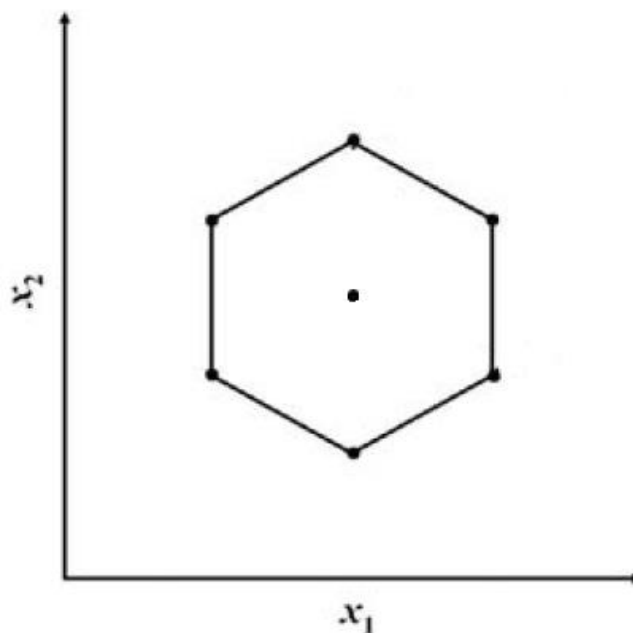
Tradicionalmente, no desenvolvimento de métodos analíticos usa-se otimizações univariadas, isto é, monitora-se a influência de um fator por vez enquanto os outros são mantidos constantes. Esse modo de otimização possui algumas desvantagens sendo a

principal a não inclusão das influências entre as outras variáveis estudadas na resposta obtida. Outras desvantagens são o maior número de experimentos necessários para proceder a pesquisa, na qual existe um consumo maior de reagentes e materiais e um período de tempo maior [29].

A alternativa para superar esses problemas nas otimizações de procedimentos analíticos é a utilização de técnicas estatísticas multivariadas. Dentre elas destaca-se a técnica chamada de metodologia de superfície resposta (RSM, do inglês *Response Surface Methodology*), que é baseada em várias funções matemáticas e estatísticas a fim de ajustar uma equação polinomial aos dados obtidos experimentalmente. Essa metodologia é usada quando se preza pela otimização simultânea dos níveis dessas variáveis a fim de se obter a melhor performance do sistema [29].

Na obtenção de superfícies de resposta alguns planejamentos são utilizados, tais como o planejamento *Box-Behnken*, planejamento do composto central e planejamento *Doehlert*. Sendo destacado este último, pois é comumente utilizado em procedimentos de preparo de amostra, sendo utilizado para duas variáveis, na qual existem três níveis para a variável X_1 e cinco níveis para a variável X_2 , conforme a Figura 10 [30].

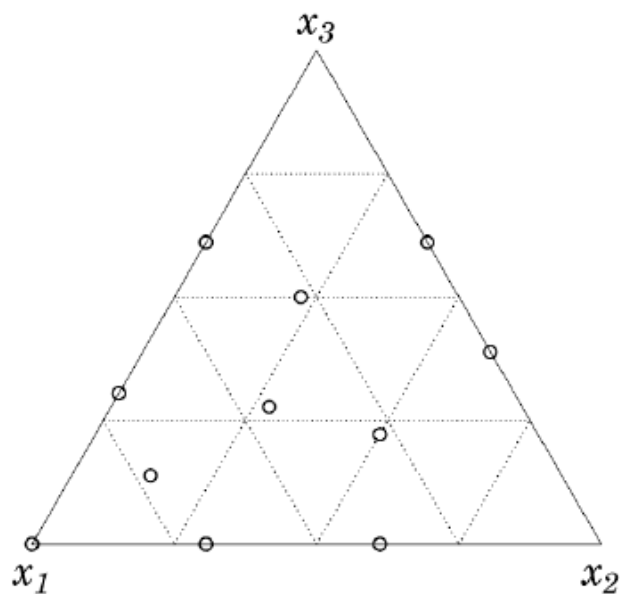
Figura 10 - Planejamento *Doehlert*.



Fonte: Adaptado de TEÓFILO *et al* (2006)

Outra técnica de planejamento é a de superfície triangular, que é muito empregada em otimizações que envolve mistura de solventes (Figura 11) ^[31].

Figura 11 – Planejamento da superfície triangular.



Fonte: NETO (2010)

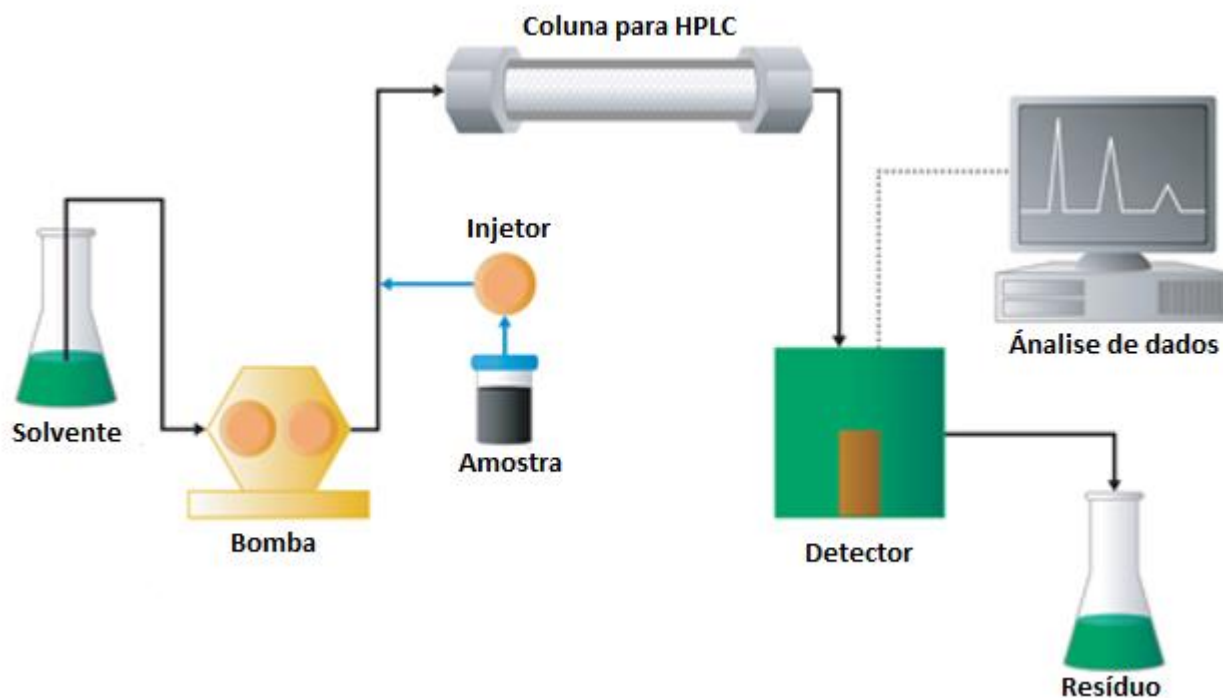
2.6 Cromatografia líquida de alta eficiência

A técnica de separação que foi utilizada nesse trabalho é conhecida como cromatografia líquida de alta eficiência, que se tornou indispensável como ferramenta analítica em muitos laboratórios. É a técnica mais empregada de cromatografia por eluição e é utilizada para a separação de uma grande variedade de espécies químicas, que variam desde materiais orgânicos e inorgânicos e se estendendo aos biológicos. Essa técnica é baseada na interação do analito com uma fase estacionária finamente dividida no interior de uma coluna e uma fase móvel líquida sob alta pressão. Existem diversos tipos de mecanismos de separação cromatográfica, tais como a de partição, adsorção, troca iônica, exclusão, afinidade ou cromatografia quiral [32].

2.6.1 Instrumentação

A instrumentação necessária na técnica de cromatografia líquida de alta eficiência é simples, contendo uma bomba, um sistema de distribuição de solventes, uma válvula de injeção de amostra, uma coluna de alta pressão, um detector e um computador para o controle do sistema e análise dos dados (Figura 12), sendo que alguns aparelhos contém um forno para controle da temperatura da coluna cromatográfica [32,33].

Figura 12 – Instrumentação de cromatografia líquida de alta eficiência.



Fonte: Adaptado de *Chemical instrumentation**

Os solventes devem ser de alto grau de pureza e com mínima quantidade de gases dissolvidos. Há dois modos de eluição em cromatografia líquida: a eluição isocrática e a eluição por gradiente. A eluição isocrática é aquela que um único solvente ou uma mistura de solventes é mantido constante durante a análise, já a eluição com gradiente é aquela na qual ocorre a variação da concentração dos solventes durante a corrida cromatográfica [32,33].

O principal componente é a coluna, na qual é responsável pelo fornecimento das interações do analito com a fase estacionária presente em seu interior, na qual pode ser polar ou apolar, dependendo da constituição do material que é feito o empacotamento da coluna. O comprimento varia de 5 a 30 cm e são comumente feitas de aço. Como possuem um custo elevado e se degradam com facilidade pela ação de partículas sólidas presentes na amostra ou no solvente e por adsorção de impurezas, muitas vezes é utilizado uma coluna de guarda de mesma fase estacionária para promover a proteção da coluna principal [32,33].

* Disponível em: <http://chemicalinstrumentation.weebly.com/hplc.html>. Acesso em nov. 2015.

A qualidade de uma bomba para a cromatografia líquida de alta eficiência deve-se a reprodutibilidade e estabilidade das vazões que ela produz, tendo consequências drásticas nos sinais obtidos. O injetor do aparelho possui alças de amostragem substituíveis, do inglês *loop*, que permite usá-la em duas posições. A posição de carregamento permite que a alça seja preenchida com uma seringa com amostra sob pressão atmosférica, e a posição de injeção permite que a amostra seja introduzida na coluna sob alta pressão [32,33].

2.6.2 Modo de detecção

Existe uma larga variedade de detectores disponíveis no mercado para os instrumentos de cromatografia líquida de alta eficiência, na qual a escolha do melhor detector depende do tipo de analito que está sendo analisado no instrumento. Alguns exemplos são os de ultravioleta, índice de refração, eletroquímico, fluorescência, condutividade, espectrometria de massas [32,33].

Um dos detectores mais amplamente empregados na cromatografia líquida é aquele baseado na absorção de radiação ultravioleta ou visível, sendo os detectores com um conjunto de fotodiodos (DAD) os mais modernos, sendo capazes de registrar o espectro inteiro de cada analito assim que ele é eluído da coluna [32,33].

Esse tipo de detector possui em sua constituição um conjunto de lâmpadas de deutério e de tungstênio que emitem radiação na região do UV-visível [31]. O desempenho global de um espectrofotômetro com arranjo de fotodiodos é determinado pelas características do detector, tais como a exatidão e precisão nas medidas de comprimento de onda, a intensidade luminosa, a resolução, a sensibilidade e a razão sinal/ruído. Esse detector oferece um espectro para cada tempo de retenção, permitindo assim a verificação da pureza do pico cromatográfico. Desta forma, a eficiência da separação também pode ser verificada ao considerar que a matriz apresente compostos nos mesmos tempos de retenção dos analitos [34].

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O principal objetivo do trabalho consiste no desenvolvimento de um procedimento eficiente de preparo de amostra para a extração de hexanal e heptanal em urina humana utilizando a microextração adsorptiva em barra (BA μ E) e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) como técnica de separação e detecção dos compostos de interesse.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Objetivos alcançados

- Otimizar a separação e detecção dos compostos no HPLC-DAD;
- Otimizar a técnica de microextração adsorptiva em barra para a extração dos aldeídos em urina humana. Sendo as variáveis otimizadas o pH da amostra, a razão molar entre o DNPH e os aldeídos, o tempo de extração, o solvente da dessorção e o tempo utilizado na dessorção.

3.2.2 Objetivos futuros

- Determinar os parâmetros de mérito do método;
- Analisar amostras de urina humana.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais e reagentes

Padrões analíticos de hexanal e heptanal foram adquiridos da Sigma-Aldrich e com estes foram preparadas soluções estoque padrão com concentração de 1000 µg/mL em metanol (J.T. Baker). A partir dessas soluções, foi preparada uma solução de trabalho contendo a mistura de padrões com concentração de 50 µg/mL de cada composto em metanol. Padrão analítico de 2,4-dinitrofenilhidrazina foi adquirido da Sigma-Aldrich e com este foi preparada uma solução estoque de 2080 µg/mL em acetonitrila (J.T. Baker) e em seguida foi preparada uma solução de trabalho com concentração de 1000 µg/mL em acetonitrila (J.T. Baker). Para a preparação da solução tampão, foram utilizados padrões analíticos de fosfato de sódio dibásico (Vetec, Brasil) e de ácido cítrico (Vetec, Brasil). Foi utilizada uma lixa para madeira e uma peneira de granulometria de 200 mesh para preparar a cortiça utilizada proveniente das rolhas de vinho. Um fio de aço inoxidável de 10 cm e uma barra magnética no formato de estrela foram utilizados nas extrações. As extrações foram realizadas em frascos de capacidade de 22 mL com tampa. Foi utilizado um aparelho de ultrassom (Ultrasomik) para as etapas de condicionamento e dessorção da barra adsortiva. Agitador Vortex 50 Hz (modelo EEQ9033, Edutec) foi utilizado na etapa de impregnação de derivatizante na barra adsortiva. A água utilizada nos experimentos foi purificada por um aparelho *Mega purity* (Billerica, EUA).

4.2 Amostras de urina

As amostras de urina utilizadas nos experimentos de otimização do método proposto foram coletadas em frascos de vidro de 40 mL, sendo essas amostras provenientes da primeira urina da manhã.

4.3 Preparo da barra adsortiva

As barras adsortivas de cortiça foram preparadas conforme o trabalho de DIAS *et al.* ^[19], na qual a cortiça utilizada é proveniente de rolhas de garrafas de vinho e antes de serem utilizadas passaram por um preparo especial. As rolhas foram colocadas em um béquer com água ultrapura e deixadas em banho ultrassônico por um período de 2h. O procedimento foi repetido quantas vezes necessário para que ocorresse a total limpeza das rolhas evidenciada pelo desaparecimento da cor amarelada ou rosada da água empregada na limpeza. Após essa limpeza, as rolhas foram colocadas na estufa com temperatura constante de 110 °C por um período de 12h. A próxima etapa foi a preparação do pó de cortiça utilizado na barra adsortiva, e para isso utilizou-se uma lixa para madeira para ralar as rolhas e com o auxílio de uma peneira de 200 mesh foi atingida a granulometria desejada para o preparo das barras. Deste modo, tubo de polipropileno foi cortado com comprimento de 15 mm e ao seu redor foi colada uma fita adesiva com largura de 10 mm (Figura 13). A fita foi recoberta com as partículas de cortiça e a barra adsortiva foi condicionada em 250 µL de acetonitrila por 15 min em um frasco sob banho ultrassônico. Após a retirada de excesso de cortiça da barra, ela foi colocada em outro frasco contendo água ultrapura por 30 min sob banho ultrassônico, sendo este último procedimento realizado quantas vezes necessário até não se verificar mais a presença de partículas de cortiça no fundo do frasco.

Figura 13 – Procedimento de preparo das barras adsorativas.



Fonte: Autoria própria (2015)

4.4 Condicionamento da barra adsorativa

Antes de cada extração a barra adsorativa foi condicionada em um frasco com 250 µL de acetoneitrila por 15 min e em seguida por mais 15 min em 250 µL de solução tampão, ambos sob banho ultrassônico (Figura 14).

Figura 14 – Procedimento de condicionamento da barra adsorativa.

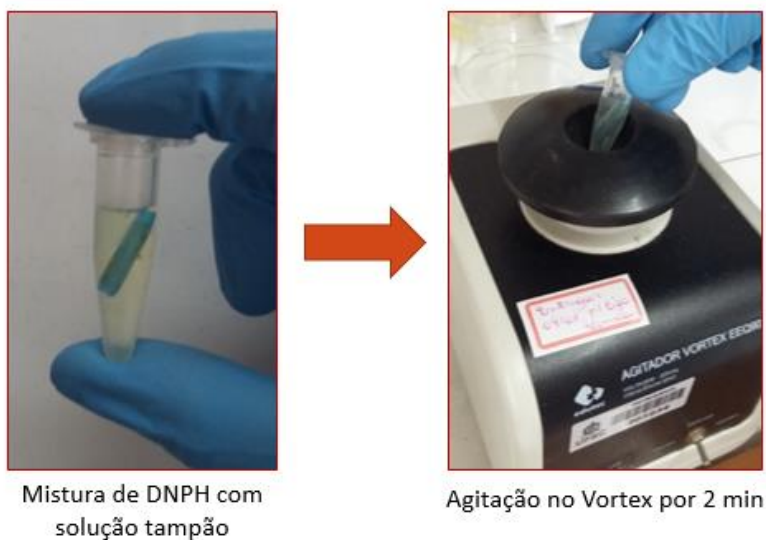


Fonte: Autoria própria (2015)

4.5 Impregnação de DNPH na barra adsortiva

Esse trabalho propõe a impregnação inédita do derivatizante na barra adsortiva. O derivatizante utilizado na reação de derivatização dos aldeídos foi o DNPH, que foi impregnado na barra adsortiva antes da etapa de cada extração. Para isso, utilizou-se *eppendorf* de 1 mL contendo uma mistura de DNPH e de solução tampão. O *eppendorf* foi colocado sobre agitação no Vortex por um período de 2 min (Figura 15).

Figura 15 – Procedimento de impregnação do derivatizante na barra adsortiva.



Fonte: Autoria própria (2015)

4.6 Extração

As extrações ocorreram em frascos com tampa de 22 mL de capacidade, contendo a amostra de urina, solução tampão, mistura dos aldeídos e água ultrapura para completar o volume de 15 mL de solução.

4.7 Instrumentação e condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo LC-20AT (Shimadzu, Japão) equipado com detector DAD modelo SPD-

M20A, com injetor manual, modelo Rheodyne 7725i (Rohnert Park, EUA) e loop de injeção de 20 μ L. A separação cromatográfica foi realizada em fase reversa com uma coluna C18 (Thermo, 250 mm x 4,6 mm e tamanho da partícula de 5 μ m). O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min em modo isocrático. Os solventes utilizados foram acetonitrila:água (88:12) e volume de injeção de amostra de 20 μ L. Os comprimentos de onda máximo monitorados foram de 290 e 360 nm.

4.8 Otimizações da técnica de microextração adsortiva em barra

4.8.1 Otimização do pH da extração

A reação de derivatização dos aldeídos com o DNPH pode ser acelerada sob condições ácidas, desta maneira, otimizações do pH da extração foram investigadas. As extrações foram realizadas com a utilização de soluções tampão (ácido cítrico/fosfato dissódico) de pH iguais a 4,0 e 4,8 em um período de tempo de 45 min, a razão molar entre o DNPH e os aldeídos foi de 40:1 e o tempo de dessorção de 20 min em acetonitrila. As extrações foram feitas em triplicata.

4.8.2 Otimização do(s) solvente(s) da dessorção

Para se obter boa eficiência de dessorção dos aldeídos derivatizados, otimizações do(s) solvente(s) empregado(s) na etapa de dessorção foram realizadas com planejamento de superfície triangular. As extrações duraram 45 min, o pH do tampão (ácido cítrico/fosfato dissódico) foi de 4,0, a razão molar entre o DNPH os aldeídos foi de 40:1 e o tempo de dessorção foi de 30 min. Sendo assim, os solventes testados foram acetonitrila, água ultrapura e metanol em razões distintas conforme mostrado na Tabela 2. O experimento 10 foi realizado em triplicata para a obtenção do RSD.

Tabela 2 – Planejamento de superfície triangular para a escolha do solvente ou mistura de solventes na dessorção.

Experimento	Água (proporção v/v)	Metanol (proporção v/v)	Acetonitrila (proporção v/v)
1	1,000000	0,000000	0,000000
2	0,000000	1,000000	0,000000
3	0,000000	0,000000	1,000000
4	0,500000	0,500000	0,000000
5	0,500000	0,000000	0,500000
6	0,000000	0,500000	0,500000
7	0,666667	0,166667	0,166667
8	0,166667	0,666667	0,166667
9	0,166667	0,166667	0,666667
10 (ponto central)	0,333333	0,333333	0,333333

4.8.3 Otimização do tempo de dessorção

Nessa otimização as extrações foram realizadas em um tempo de 45 min, o pH da solução tampão utilizada foi de 4,0, a razão molar entre o DNPH os aldeídos foi de 40:1 e o tempo de dessorção foi variado, sendo de 10, 20 e 30 min em acetonitrila. As extrações para cada tempo de dessorção foram realizadas em triplicata.

4.8.4 Otimização da quantidade de DNPH e do tempo de extração

Para essa otimização foram realizados nove experimentos com planejamento *Doehlert*, na qual a razão molar entre o DNPH e os aldeídos foi variado na faixa de 10:1 a 50:1, e também o tempo de extração foi estudado em 30, 60 e 90 min, conforme mostrado na Tabela 3. Com relação aos demais parâmetros, pH da solução tampão utilizada foi mantido em 4,0 e a dessorção foi feita em acetonitrila por 10 min.

Tabela 3 - Planejamento *Doehlert* para a otimização da quantidade de DNPH e do tempo de extração.

Experimento	Razão molar (DNPH:aldeídos)	Tempo (min)
1	50:1	60
2	40:1	90
3	10:1	60
4	20:1	30
5	40:1	30
6	20:1	90
7	30:1	60
8	30:1	60
9	30:1	60

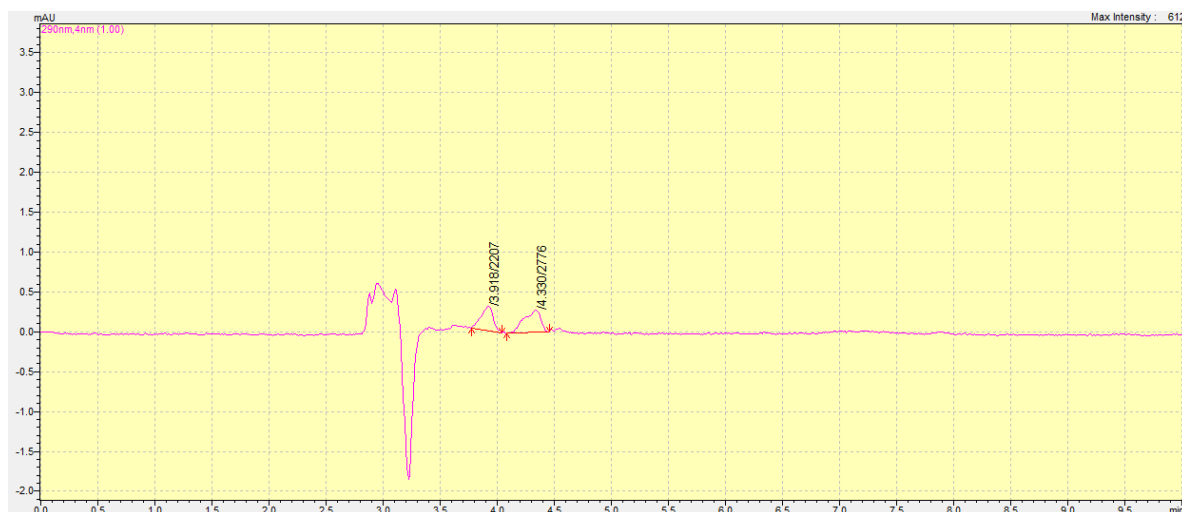
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimizações cromatográficas

5.1.1 Tempo de retenção dos analitos

Inicialmente, foram utilizadas duas soluções de mistura dos padrões dos aldeídos com concentrações de 200 e 500 mg/L a fim de obter o tempo de retenção para cada analito. A fase móvel empregada, em um primeiro momento, foi de metanol:água (85:15) em modo isocrático conforme a literatura [35] com monitoramento em 290 nm, comprimento de onda máximo de absorção dos aldeídos [36] e obteve-se os cromatogramas abaixo (Figuras 16 e 17):

Figura 16 - Cromatograma obtido a partir da injeção de 20 µL da solução da mistura dos aldeídos de concentração 200 mg/L.



Fonte: Autoria própria (2015)

Figura 17 - Cromatograma obtido a partir injeção de 20 µL da solução da mistura dos aldeídos de concentração 500 mg/L.



Fonte: Autoria própria (2015)

A análise dos cromatogramas acima revela que os tempos de retenção são de 3,91 min para o hexanal e 4,33 min para o heptanal. Outra informação obtida a partir dos cromatogramas é a variação da área obtida dos picos para os dois analitos, sendo que para o hexanal houve uma variação de 2207 para 6349 e para o heptanal ocorreu a variação de 2776 para 6964, o que corresponde um aumento de aproximadamente 2,5 vezes, que é a razão do aumento da concentração entre as duas análises. A partir disso, foi possível verificar o tempo de retenção dos aldeídos e ao mesmo tempo a baixa detectabilidade da técnica instrumental de HPLC-DAD para estes analitos. Isto ressalta a importância do uso da reação de derivatização para a determinação de hexanal e heptanal por HPLC-DAD.

5.1.2 Estudo da eficiência da derivatização

No estudo da eficiência da derivatização foram feitas duas extrações: uma utilizando a reação de derivatização e a outra com a ausência dessa reação. As amostras foram injetadas no instrumento sendo monitorados os comprimentos de onda de 290 e 360 nm, e obteve-se os cromatogramas abaixo (Figuras 18 e 19):

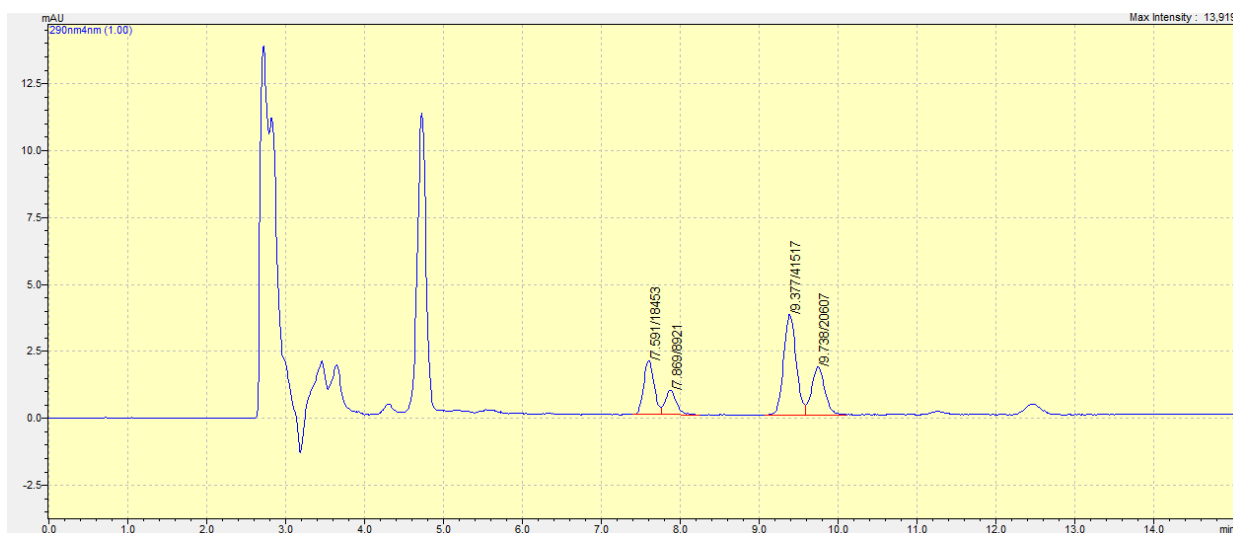
Figura 18 - Cromatograma obtido a partir da extração com a mistura dos aldeídos de concentração 500 µg/L sem derivatização.



*Condições BAµE: 12,850 mL de água ultrapura fortificada com 500 µg/L dos analitos, 2 mL de solução tampão (ácido cítrico/fosfato dissódico) de pH igual a 4,8, tempo de extração de 45 min, dessorção com 250 µL de acetonitrila por 20 min.

Fonte: Autoria própria (2015)

Figura 19 - Cromatograma obtido a partir da extração com a mistura dos aldeídos de concentração 500 µg/L com derivatização.



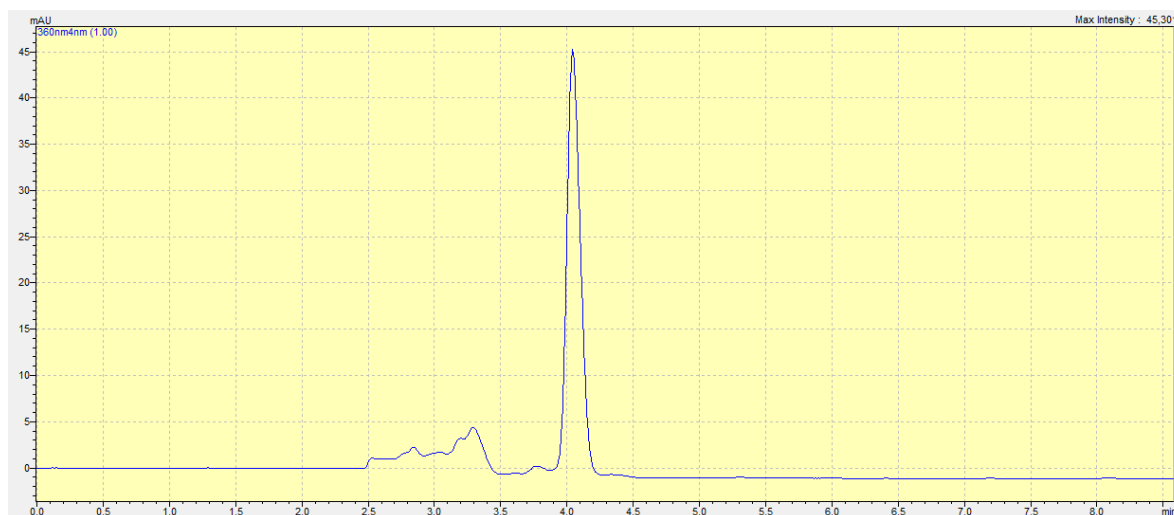
*Condições BAµE: 12,850 mL de água ultrapura fortificada com 500 µg/L dos analitos, 2 mL de solução tampão (ácido cítrico/fosfato dissódico) de pH igual a 4,8, tempo de extração de 45 min, dessorção com 250 µL de acetonitrila por 20 min.

Fonte: Autoria própria (2015)

A análise dos cromatogramas acima indica que a utilização da reação de derivatização é fundamental nas extrações para a obtenção dos picos correspondentes aos dois analitos, pois não houve sinal associado ao hexanal no primeiro cromatograma, como pode ser observado na Figura 18. Ao contrário do primeiro cromatograma, o segundo apresentou picos correspondentes aos dois analitos com áreas maiores, mas duplicados. A ocorrência dessa duplicação dos picos pode ser explicada baseada no mecanismo de reação de derivatização, na qual essa reação forma os esteroisômeros E e Z conforme os estudos de UCHIYAMA *et al.* A análise do comprimento de onda máximo dos picos duplicados obtidos no cromatograma revela que os picos referentes ao hexanal e ao heptanal possuem comprimentos de onda diferentes entre si, estando de acordo com a Tabela 1. O pico em 4,72 min corresponde ao derivatizante DNPH com absorção no comprimento de onda máximo de 360 nm.

Para se ter total confiança de que os picos duplicados são dos esteroisômeros e não referentes a amostra, um branco da extração foi realizado e o cromatograma obtido (Figura 20) mostra a inexistência de picos cromatográficos nos tempos de retenção dos analitos, o que evidencia que os picos duplicados são relativos aos dois esteroisômeros. O cromatograma apenas mostra o pico referente ao DNPH utilizado no procedimento de extração. Para superar o problema de duplicação dos picos, otimizações de solvente e/ou misturas de solventes da fase móvel do HPLC foram realizadas.

Figura 20 - Cromatograma do branco da barra adsortiva.



*Condições BAμE: 13 mL de água ultrapura, 2 mL de solução tampão (ácido cítrico/fosfato dissódico) de pH igual a 4,8, tempo de extração de 45 min, dessorção com 250 μL de acetonitrila por 20 min.

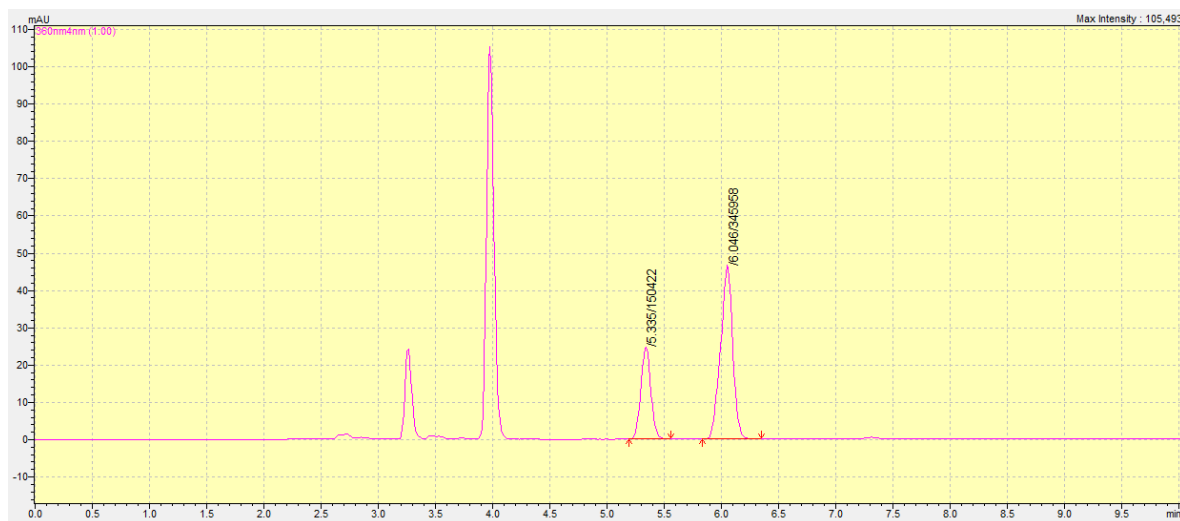
Fonte: Autoria própria (2015)

5.1.3 Escolha do(s) solvente(s) empregado(s) na separação cromatográfica

Quando empregada reações de derivatização em quantificações, o composto é transformado em um derivado e nesse caso, como observado anteriormente, cada aldeído está formando dois derivados: os esteroisômeros E e Z. A proposta deste estudo é que as condições cromatográficas sejam alteradas de forma que coeluam os dois esteroisômeros derivados do hexanal e do heptanal, ao invés de otimizar a reação de derivatização.

Nesse estudo, variou-se a razão de metanol:água de 85:15 para até 100% de metanol gradativamente para verificar se a duplicação dos picos diminuía, deste modo, constatou-se a diminuição da duplicação, mas não a coeluição dos dois esteroisômeros responsáveis pela duplicação do pico. Sendo assim, trocou-se a fase móvel para acetonitrila:água (88:12) em modo isocrático e obteve-se a melhor condição, pois os picos coeluíram e a separação cromatográfica ocorreu em um intervalo de tempo menor (6,50 min), como pode ser verificado na Figura 21 abaixo:

Figura 21 - Cromatograma obtido a partir da extração com a mistura dos aldeídos de concentração 500 µg/L com derivatização e fase móvel otimizada.



*Condições BAµE: 10 mL de água ultrapura fortificada com 500 µg/L dos analitos, 2,970 mL de amostra de urina, 2 mL de solução tampão (ácido cítrico/fosfato dissódico) de pH igual a 4,8, tempo de extração de 45 min, dessorção com 250 µL de acetonitrila por 20 min.

Fonte: Autoria própria (2015)

Os tempos de retenção obtidos com essa fase móvel foram de 5,34 min para o hexanal e de 6,05 min para o heptanal.

5.1.4 Verificação da seletividade da barra adsortiva e da separação cromatográfica

Para verificar a seletividade da barra adsortiva e da separação cromatográfica para os analitos estudados foi realizada uma extração sem a adição dos analitos na amostra de urina. O cromatograma dessa extração está demonstrado na Figura 22 abaixo:

Figura 22 - Cromatograma do branco da barra adsortiva na presença de urina.



*Condições BAμE: 10 mL de água ultrapura, 3 mL de amostra de urina, 2 mL de solução tampão (ácido cítrico/fosfato dissódico) de pH igual a 4,8, tempo de extração de 45 min, dessorção com 250 μL de acetonitrila por 20 min.

Fonte: Autoria própria (2015)

Verifica-se que nos tempos de retenção iguais a 5,34 min e de 6,05 min não houve a presença de picos, o que indica que a barra adsortiva empregada nas extrações com derivatização é seletiva para os analitos. Também, conforme mencionado no item 5.1.2 novamente confirma que os picos duplicados obtidos nos cromatogramas com a fase móvel inicial empregada eram relativos aos esteroisômeros formados na reação de derivatização.

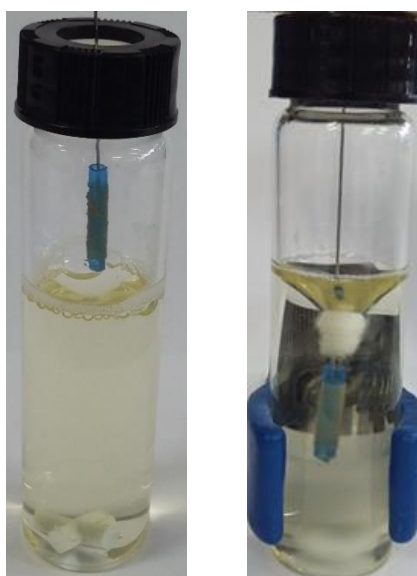
5.2 Nova proposta para a técnica de BAμE

Durante o desenvolvimento do trabalho, notou-se que a barra adsortiva utilizada não girava e nem flutuava uniformemente segundo os fundamentos da técnica de BAμE, sendo alguns fatores responsáveis por este fato. Uma das causas é a densidade da amostra de urina, pois a primeira urina da manhã utilizada como amostra nesse trabalho possui uma quantidade elevada de substâncias sólidas dissolvidas, tais como sais minerais. Isto faz com que a densidade dessa amostra seja elevada, o que dificulta o movimento rotatório e flutuação da barra adsortiva nas extrações. Para tentar solucionar esse problema, o fator de diluição da amostra de urina foi alterado de 5 para 7, o

desempenho melhorou, mas não foi satisfatório. Outro fator é a impregnação do derivatizante na barra adsortiva antes da etapa de cada extração, o que faz com que a massa da barra adsortiva aumente, e consequentemente a sua densidade, desta maneira, prejudicando a sua flutuação também.

Tendo em vista estes problemas, o presente trabalho propõe um remodelamento inédito para a técnica de BA μ E, na qual se propõe a utilização de uma haste de aço inoxidável com uma pequena volta na extremidade, servindo de suporte para a barra adsortiva, na qual a haste é fixada na tampa do frasco através de um orifício. Para a etapa de extração, a haste contendo a barra adsortiva é abaixada para entrar em contato com a amostra e a agitação magnética é feita através de uma barra magnética no formato de estrela. Essa barra proporciona uma forte agitação e há a formação de bolhas logo acima da barra adsortiva como observado na Figura 23, sendo assim, esse agitador possui um maior desempenho na agitação, permitindo uma maior eficiência na rotação da barra adsortiva e consequentemente na adsorção dos analitos.

Figura 23 - Esquema proposto da modificação da técnica de BA μ E.



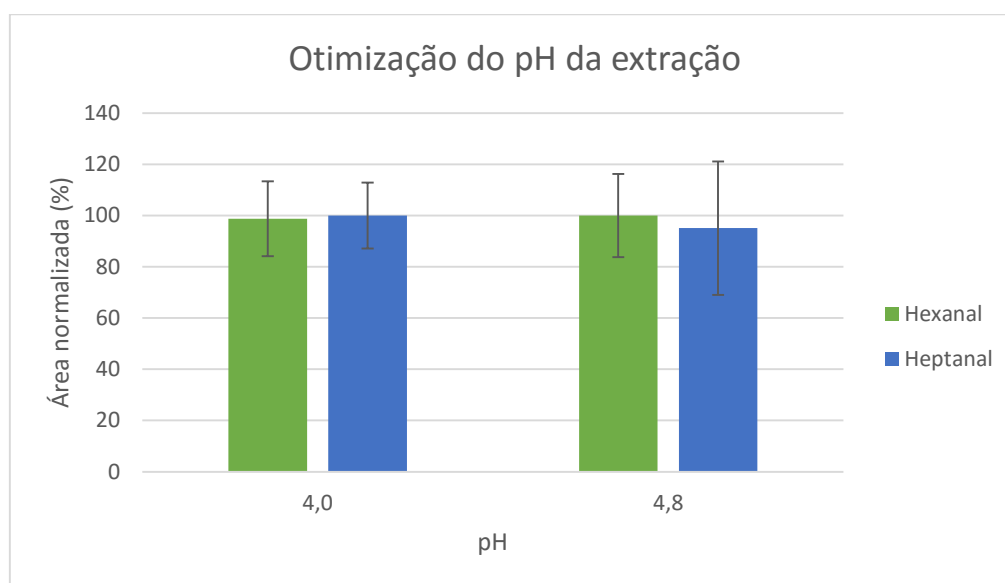
Fonte: Autoria própria (2015)

5.3 Otimizações do método

5.3.1 Otimização do pH da extração

A análise da Figura 24 demonstra que em ambos pH foram obtidas boas áreas para ambos analitos, mas como o pH igual a 4,0 apresentou menores valores de erros comparado aos erros do pH igual a 4,8 o pH de 4,0 foi adotado para a realização das extrações. O valor do pH da solução tampão escolhido está de acordo com os estudos de LIU *et al*, pois o pH da amostra com a adição de 2 mL de solução tampão de pH igual a 4,0 fica em torno de 4,8.

Figura 24 – Gráfico da otimização do pH da extração.



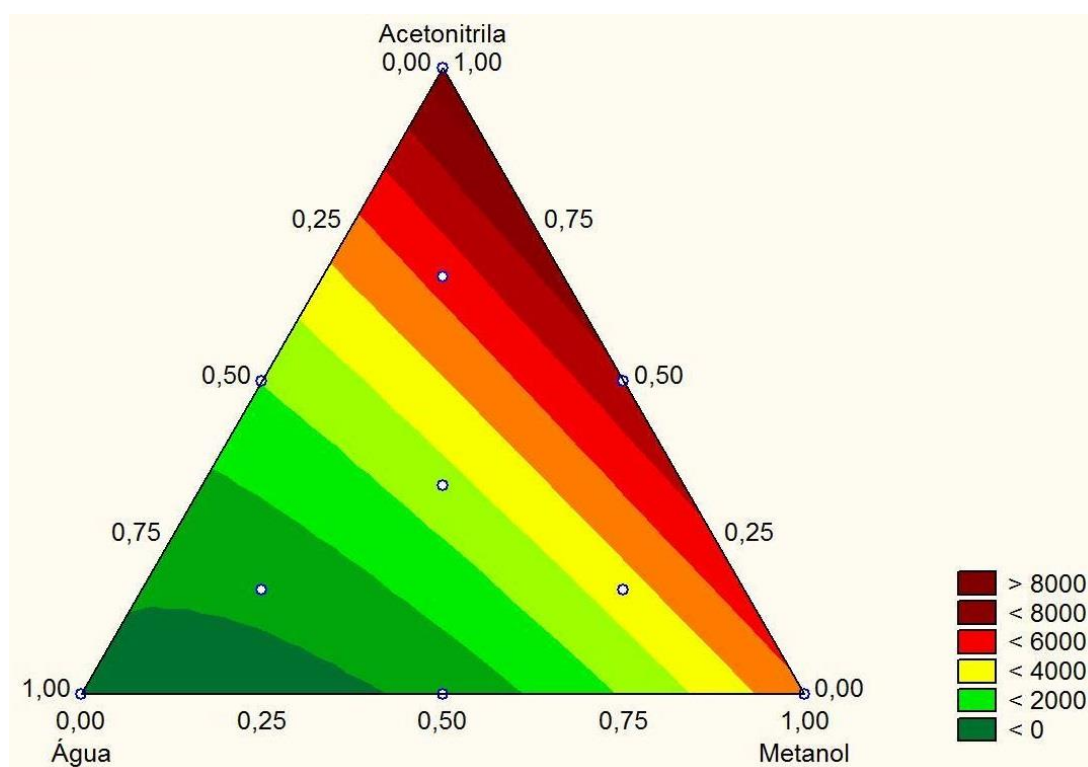
*Condições BAμE: 10,860 mL de água ultrapura, 2118,6 μL de urina fortificada com 500 μg/L de mistura de aldeídos, 2 mL de solução tampão (ácido cítrico/fosfato dissódico), tempo de extração de 45 min, dessorção líquida em 250 μL de solvente por 20 min.

Fonte: Autoria própria (2015)

5.3.2 Otimização do(s) solvente(s) da dessorção

Essa otimização foi feita com o planejamento de superfície triangular, a qual apresentou uma função quadrática com R^2 igual a 0,9073. Os solventes testados foram acetonitrila, água ultrapura e metanol e a melhor resposta foi obtida com 100% de acetonitrila como mostrado na Figura 25. O solvente escolhido está de acordo com os estudos realizados por LIU *et al.* previamente.

Figura 25 – Superfície resposta da otimização do(s) solvente(s) de dessorção líquida.



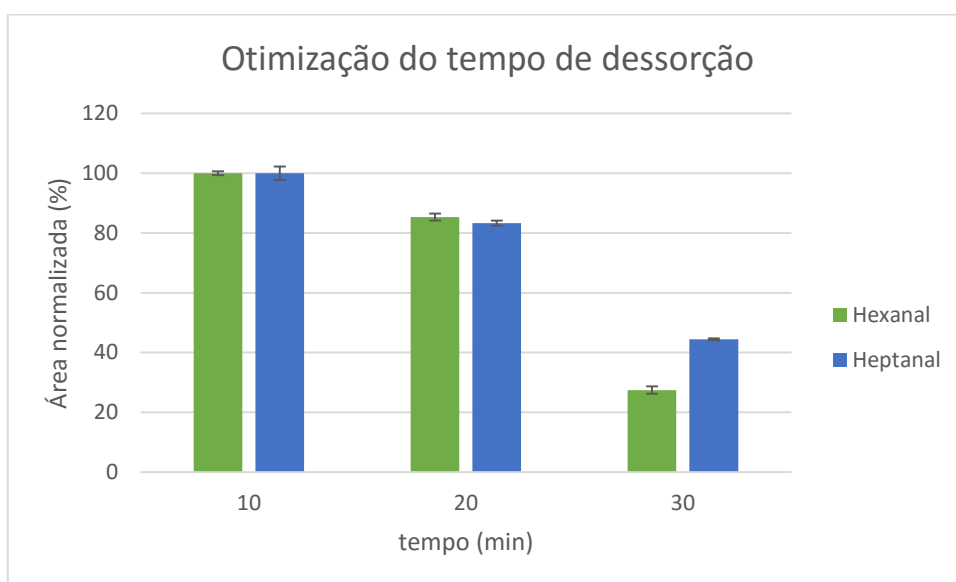
*Condições BA μ E: 10,860 mL de água ultrapura, 2118,6 μ L de urina fortificada com 500 μ g/L de mistura de aldeídos, 2 mL de solução tampão (ácido cítrico/fosfato dissódico) de pH = 4,0, tempo de extração de 60 min, dessorção líquida em 250 μ L de solvente por 30 min.

Fonte: Autoria própria (2015)

5.3.3 Otimização do tempo de dessorção

O tempo de dessorção foi estudado nos tempos de 10, 20 e 30 min utilizando acetonitrila como solvente de dessorção, pois foi o solvente que apresentou melhor resposta no estudo anterior. A Figura 26 abaixo demonstra que o tempo de 10 min foi o tempo que se obteve a melhor resposta, sendo assim, 10 min foi escolhido como o tempo de dessorção líquida.

Figura 26 - Gráfico da otimização do tempo de dessorção.



*Condições BA μ E: 10,860 mL de água ultrapura, 2118,6 μ L de urina fortificada com 500 μ g/L de mistura de aldeídos, 2 mL de solução tampão (ácido cítrico/fosfato dissódico) de pH = 4,0, tempo de extração de 45 min, dessorção líquida em 250 μ L de solvente por tempos variados.

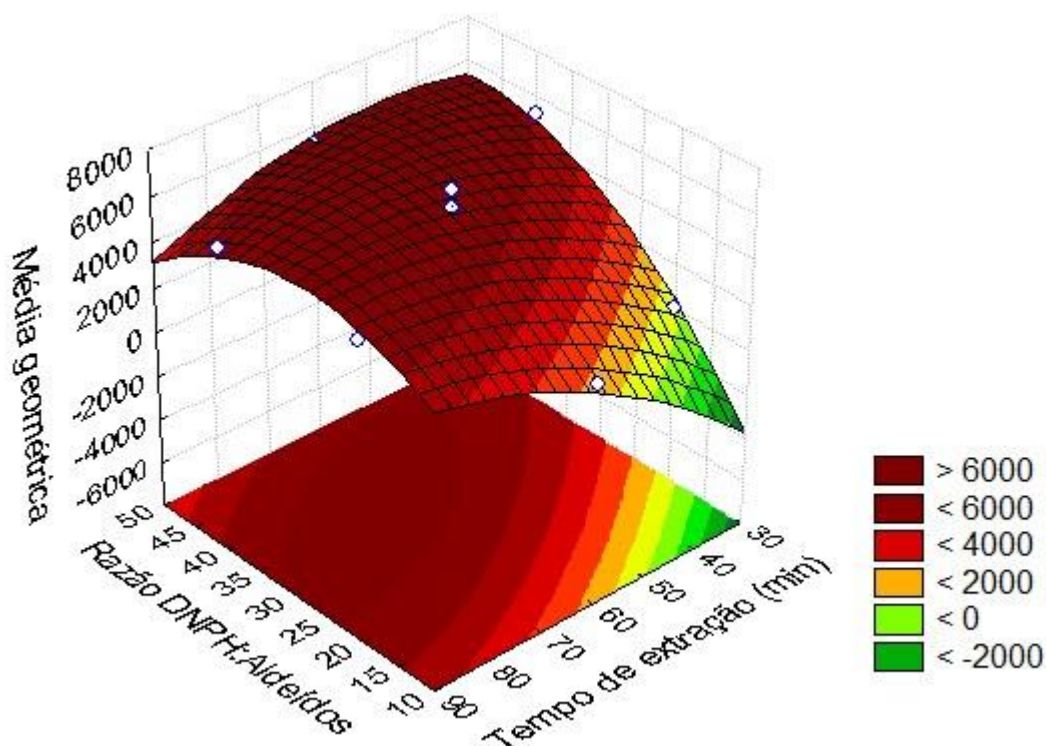
Fonte: Autoria própria (2015)

5.3.4 Otimização da quantidade de DNPH e do tempo de extração

Nessa última otimização foi empregada abordagem multivariada através do planejamento *Doehlert*, sendo o tempo de extração e a razão molar entre o DNPH e os aldeídos as variáveis. A Figura 27 mostra a superfície de resposta obtida através desse

experimento a qual apresentou R^2 igual a 0,9579. Pode-se observar que, a razão molar de 40:1 e o tempo de extração de 60 min apresentaram boa eficiência, e por isso, foram escolhidas como condições ótimas para este trabalho, sendo a razão de 40:1 entre o DNPH e os aldeídos de acordo com o trabalho de LIU *et al.*

Figura 27 – Superfície resposta obtida para a otimização da quantidade de DNPH e do tempo de extração.



*Condições BA μ E: 10,860 mL de água ultrapura, 2118,6 μ L de urina fortificada com 500 μ g/L de mistura de aldeídos, 2 mL de solução tampão (ácido cítrico/fosfato dissódico) de pH = 4,0, tempo de extração variado, dessorção líquida em 250 μ L de solvente por 10 min.

Fonte: Autoria própria (2015)

6 CONCLUSÕES

O método proposto por esse trabalho mostrou-se eficiente na extração de dois compostos conhecidos como bioindicadores de câncer pulmonar em amostras de urina humana através do uso da cortiça como fase extratora na técnica de BAμE.

A detecção e separação foi otimizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, na qual erros analíticos de quantificação dos analitos devido a isomerização advinda da reação de derivatização necessária para detecção dos mesmos foram sanados.

A impregnação inédita do derivatizante na barra adsortiva demonstrou-se válido no desenvolvimento deste método, pois garante uma boa sensibilidade ao método. No entanto, este fator foi um dos responsáveis pelo aumento da densidade da barra adsortiva o que culminou no desempenho baixo de flutuação e rotação da barra na técnica de extração utilizada, desta maneira, a proposta de um remodelamento da técnica solucionou esse problema.

Tendo o conhecimento de todos os parâmetros ótimos de derivatização, extração, dessorção e separação/detecção cromatográfica, curvas de calibração na matriz podem ser obtidas para posterior análises de quantificação dos aldeídos em amostras de urina. Assim, alguns parâmetros de mérito como faixa linear de trabalho, linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação serão avaliados para posteriormente serem anexados aos dados contidos nesse trabalho. Desta forma, será possível a elaboração de um artigo científico passível de submissão em revistas da área, levando-se em consideração, que até o presente momento, metodologias analíticas utilizando a técnica de BAμE com impregnação de derivatizante na barra adsortiva e com a utilização da haste propostas nesse trabalho ainda não foram apresentadas na literatura.

De maneira geral, o método desenvolvido pode ser utilizado na quantificação desses dois bioindicadores de câncer pulmonar em amostras de urina humana como uma alternativa para solucionar a falta de sintomas característicos na fase inicial do tumor, sendo assim, mostrando-se como uma possibilidade de um diagnóstico precoce de câncer de pulmão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional de Câncer (INCA). **O que é câncer?** Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 31 mai. 2015.
2. Albert Einstein. **O que é a metástase?** Disponível em: <<http://www.einstein.br/einstein-saude/em-dia-com-a-saude/Paginas/o-que-e-a-metastase.aspx>>. Acesso em: 01 nov. 2015.
3. **Centro de Combate ao Câncer.** Disponível em: <<http://www.cccancer.net/site/index.php/as-causas-do-cancer/>>. Acesso em: 31 mai. 2015.
4. Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Pulmão.** Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pulmao>>. Acesso em: 31 mai. 2015.
5. Minha vida. **Câncer de pulmão.** Disponível em: <<http://www.minhavidade.com.br/saude/temas/cancer-de-pulmao>>. Acesso em: 31 mai. 2015.
6. Albert Einstein. **Câncer de pulmão.** Disponível em: <<http://www.einstein.br/einstein-saude/em-dia-com-a-saude/Paginas/cancer-do-pulmao.aspx>>. Acesso em: 31 mai. 2015.
7. ASENSIO-RAMOS, M., RAVELO-PÉREZ, L.M., GONZÁLES-CURBELO, M.A., HERNÁNDES-BORGES, J. Liquid phase microextraction applications in food analysis. **Journal of Chromatography A**, 7 jun. 2011. Vol. 1218, p. 7415-7437.
8. MAGALHÃES, I.R.S., OLIVEIRA, A.R.M., BONATO, P.S. Fundamentos e avanços recentes da microextração em fase líquida empregando membranas cilíndricas ocas (LPME). **Scientia Chromatographica**, 2009. Vol. 1, n. 4, p. 11-17.
9. OLIVEIRA, A.R.M., MAGALHÃES, I.R.S., SANTANA, F.J.M., BONATO, P.S. Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, 2008. Vol. 31, n. 3, p. 637-644.
10. ROCHA, D.L., BATISTA, A.D., ROCHA, F.R.P., DONATI, G.L., NÓBREGA, J.A. Greening sample preparation in inorganic analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, 2013. Vol. 45, p. 79-92.
11. CARASEK, E., MERIB, J. Membrane-based microextraction techniques in analytical chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**, 20 fev. 2015. Vol. 880, p. 8–25.

12. NOGUEIRA, J.M.F. Microextração adsortiva em barra (BA μ E): Um conceito analítico inovador para microextração estática. **Scientia Chromatographica**, 2013. Vol. 5, p. 275-283.
13. BALTUSSEN, E., SANDRA, P., DAVID, F., CRAMERS, C. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. **Journal of Microcolumn Separation**, 1999. Vol. 11, p. 737-747.
14. LUCENA, R. Extraction and stirring integrated techniques: examples and recent advances. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2012. Vol. 403, p. 2213-2223.
15. NOGUEIRA, J.M.F. Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. **Analytica Chimica Acta**, 2012. Vol. 757, p. 1-10.
16. DEMIRBAS, A. Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: A review. **Journal of Hazardous Materials**, 2008. Vol. 157, p. 220-229.
17. SILVA, L. M. **Estudo da Potencialidade dos Resíduos de Umbu, Manga e Goiaba como Bioadsorventes**. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.
18. DIAS, A.N. SILVA, A.C., SIMÃO, V., MERIB, J., CARASEK, E. A novel approach to bar adsorptive microextraction: Cork as extractor phase for determination of benzophenone, triclocarban and parabens in aqueous samples. **Analytica Chimica Acta**, 12 ago. 2015. Vol. 888, p. 59-66.
19. DIAS, A.N., SIMÃO, V., MERIB, J., CARASEK, E. Use of green coating (cork) in solid-phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in water by gas chromatography-electron capture detection. **Talanta**, 2015. Vol. 134, p. 409-414.
20. DIAS, A.N., SIMÃO, V., MERIB, J., CARASEK, E. Cork as a new (green) coating for solid-phase microextraction: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 2013. Vol. 772, p. 33-39.
21. NETO, C.P. ^{13}C solid-state nuclear magnetic resonance and Fourier transform infrared studies of the thermal decomposition of cork. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, 1995. Vol. 4, p. 143-151.
22. OLIVELLA, M.A. The use of cork waste as a biosorbent for persistent organic pollutants- Study of adsorption/desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, 2011. Vol. 46, p. 824-832.
23. OLIVELLA, M.A., BAZZICALUPI, C., BIANCHI, A., FIOL, N., VILLAESCUSA, I. New insights into the interactions between cork chemical components and pesticides. The

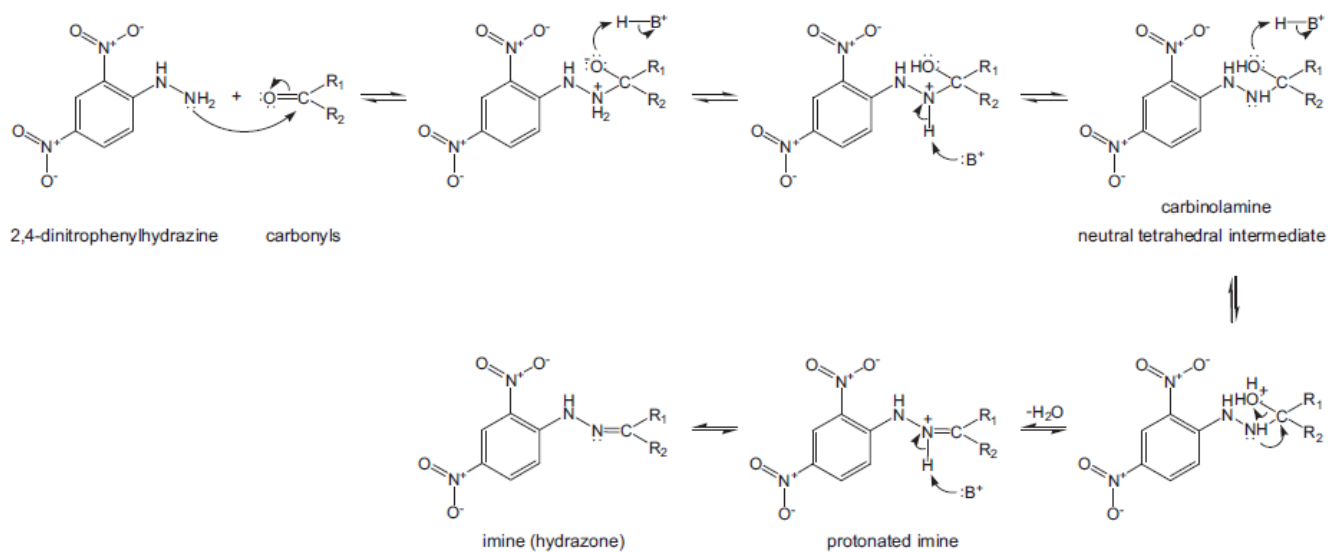
contribution of π - π interaction, hydrogen bonding and hydrophobic effect. **Chemosphere**, 2015. Vol. 119, p. 863 – 870.

24. LIU, J.F., YUAN, B.F., FENG, Y.Q. Determination of hexanal and heptanal in urine using magnetic solid phase extraction coupled with *in-situ* derivatization by high performance liquid chromatography. **Talanta**, 2015. Vol. 136, p. 54-59.
25. ALI, M.F.B., KISHIKAWA, N., OHYAMA, K., MOHAMED, H.A.M., ABDEL-WADOOD, MOHAMED, A.M. , KURODAB, N. Chromatographic determination of aliphatic aldehydes in human serum after pre-column derivatization using 2,2'-furil, a novel fluorogenic reagent. **Journal of Chromatography A**, 26 mar. 2013. Vol. 1300, p. 199–203.
26. LILI, L., XU, H., SONG, D., CUI, Y., HU, S., ZHANG, G. Analysis of volatile aldehyde biomarkers in human blood by derivatization and dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 4 fev. 2010. Vol. 1217, p. 2365–2370.
27. UCHIYAMA, S., INABA, Y., KUNUGITA, N. Derivatization of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high performance liquid Chromatography. **Journal of Chromatography B**, 2011. Vol 879, p. 1282-1289.
28. ARAUJO, P.W., BRERETON, R.G. Experimental design II: Optimization. **Trends in Analytical Chemistry**, 1996. Vol. 15, p. 63.
29. BEZERRA, M.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimizations in analytical chemistry. **Talanta**, 2008. Vol. 76, p. 965-977.
30. TEÓFILO, R.F., FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, 2006. Vol. 29, p. 338-350.
31. NETO, B.B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na pesquisa**. 4ª Edição, Editora Bookman, 2010. 414 p.
32. SKOOG, A.D., WEST, D.M., HOLLER, F.J., CROUCH, R.S. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana, São Paulo: Editora Thomson, 2006. 1104 p.
33. HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. Tradução da 7ª edição, Rio de Janeiro: Editora LTC, 2008. 867 p.
34. RAIMUNDO JR., I.M., PASQUINI. C. Espectrofotometria Multicanal E Arranjos De Fotodiodo. **Química Nova**, jan - fev. 1997. Vol. 20, n.1, p. 83-88.
35. ZHANG, H.J., HUANG, J.F., LIN, B., FENG, Y.Q. Polymer monolith microextraction wit in situ derivatization and its application to high-performance liquid chromatography determination of hexanal and heptanal in plasma. **Journal of Chromatography A**, 2007. Vol. 1160, p. 114-119.

36. JIMENEZ, E., LANZA, B., MARTINEZ, E., ALBALADEJO, J. Daytime tropospheric loss of hexanal and trans-2-hexenal: OH kinetics and UV photolysis. **Atmospheric Chemistry and Physics**, 2007. Vol. 7, p. 1565-1574.

ANEXOS

Anexo 1 – Mecanismo da reação de derivatização de compostos carbonílicos com DNPH.



Fonte: UCHIYAMA *et al.* (2011)